

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-143881

(43) 公開日 平成7年(1995)6月6日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	7236-4B		
1/21		9152-4B		
9/78		9050-4B		
		C 1 2 N 15/ 00	Z N A A	
		(C 1 2 N 15/ 00	Z N A A	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-275482	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成5年(1993)11月4日	(72) 発明者	伊藤 潔 長崎市中円園町4-18 浅野コーポ201号
(31) 優先権主張番号	特願平5-245285	(72) 発明者	芳本 忠 長崎市消石2-29-10
(32) 優先日	平5(1993)9月30日	(72) 発明者	鶴 大典 長崎市白鳥町10-16-502
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

(54) 【発明の名称】 クレアチンデイミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA並びにクレアチンデイミナーゼの製造法

(57) 【要約】

【目的】 クレアチンデイミナーゼを遺伝子工学的手法によって、純粋な形で安価に大量供給しうる手段を提供する。

【構成】 配列表の配列番号2に記載されたアミノ酸配列をコードするDNAであるクレアチンデイミナーゼの遺伝情報を有するDNA断片、該DNA断片を組み込んだ組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該形質転換体を培地中にクレアチンを添加することなく培養し、クレアチンデイミナーゼを生成させ、該クレアチンデイミナーゼを採取することを特徴とするクレアチンデイミナーゼの製造法。

【効果】 高価である誘導物質、クレアチンを添加する必要がない。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クレアチンデヒミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA断片。

【請求項2】 配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸配列をコードする請求項1に記載されるDNA断片。

【請求項3】 配列表の配列番号1に記載される塩基配列を含有する請求項1に記載されるDNA断片。

【請求項4】 請求項2に記載されるDNA断片を有する組換えベクター。

【請求項5】 請求項4に記載される組換えベクターで形質転換された形質転換体。 10

【請求項6】 請求項5に記載された形質転換体を培地で培養し、クレアチンデヒミナーゼを生成させ、該クレアチンデヒミナーゼを採取することを特徴とするクレアチンデヒミナーゼの製造法。

【請求項7】 約37℃付近の温度にて培養することを特徴とする請求項6に記載されるクレアチンデヒミナーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、クレアチンデヒミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA断片、該DNA断片を有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体及び該形質転換体を使用するクレアチンデヒミナーゼを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 クレアチンデヒミナーゼ (EC 3.5.4.2) は、クレアチンをN-メチルヒダントインとアンモニアへ加水分解する反応を触媒する酵素であり、体液中のクレアチンを測定する試薬として使用されている。クレアチンデヒミナーゼの供給源としては、バチルス属細菌 (特開昭61-219383号公報)、コリネバクテリウム属細菌 (特開昭52-34976号公報)、フラボバクテリウム属細菌 (The Journal of Biological Chemistry Vol. 260 No. 7 p3915-3922, 1985) などが知られている。しかしながら、これらの細菌のクレアチンデヒミナーゼ生産量は充分なものではなかった。またこれらの細菌でクレアチンデヒミナーゼを生産するためには、培地に誘導物質であるクレアチンを添加することが必要である。しかしながら、クレアチンが高価であることから、工業的にクレアチンデヒミナーゼを生産する際、クレアチンを必要としない安価な製造法が求められていた。

【0003】 誘導物質を必要とする細胞からの酵素の遺伝子を、他の細胞へ導入して遺伝子工学的に酵素を生産することにより、誘導物質を必要とせず、安価に酵素を生産することは、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼなどの酵素では実施されている。しかしながら、クレアチンデヒミナーゼでは、そのアミノ酸配列および遺 50

伝子が未知であり、遺伝子工学的に生産することは今まで行われていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、クレアチンデヒミナーゼを有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA断片を単離し、その分子構造を明らかにするとともに、クレアチンデヒミナーゼ活性を有する蛋白質を遺伝子工学的手法によって、純粋な形で安価に大量供給しうる手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成するため、クレアチンデヒミナーゼ生産菌の菌体から抽出した染色体DNAより、クレアチンデヒミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA断片の単離に成功し、そのDNAの全構造を決定した。更に、本クレアチンデヒミナーゼを遺伝子工学的手法を用いて形質転換体により誘導物質のない条件下で高生産させることに成功し、高純度なクレアチンデヒミナーゼを安価に大量供給することを可能にした。

20 【0006】 すなわち本発明はクレアチンデヒミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA断片であり、その一例として配列表の配列番号2に記載されるアミノ酸をコードするDNA断片、例えば配列番号1に記載される塩基配列を含有するものが挙げられる。

【0007】 また本発明は上記DNA断片を有する組換えベクターである。

【0008】 さらに本発明は上記組換えベクターで形質転換された形質転換体である。

30 【0009】 また本発明は上記形質転換体を培地で培養し、クレアチンデヒミナーゼを生成させ、該クレアチンデヒミナーゼを採取することを特徴とするクレアチンデヒミナーゼの製造法である。

【0010】 本発明のクレアチンデヒミナーゼ生産菌としては、クレアチンデヒミナーゼを生産する菌株であれば、特に限定されないが、本発明の実施例においては、バチルス・エスピーCNI-1365 (微工研菌寄第8138号) を利用した。

40 【0011】 これらの菌を培養する培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じて硝酸塩、リン酸塩等を含有するものがある。炭素源としては、澱粉あるいは澱粉加水分解物、糖蜜、ペプトン類等が用いられる。窒素源としては、ポリペプトン、トリプトン、肉エキス、酵母エキス等が使用できる。培養は好気的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節することが望ましい。培養時間は培養物のクレアチンデヒミナーゼ活性が最高になるところまで行なう。

50 【0012】 培養物より、クレアチンデヒミナーゼを精製するには、次の様な方法が用いられる。培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによってクレアチンデヒミナーゼ含有溶菌物を調製する。溶

菌方法としては、例えばリゾチームや β -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素による処理や超音波破碎、ダイノミル破碎処理等の物理的破碎法が好適である。この様にして得られた溶菌物を硫酸沈澱分画し、脱塩した後、陽イオン交換カラム、陰イオン交換カラムやヒドロキシルアパタイトカラム等の担体にかけてカラムクロマトグラフィーによる分画を行なう。

【0013】本発明のクレアチンデイミナーゼ活性を有する蛋白質の遺伝情報を有するDNA（以下、クレアチンデイミナーゼ遺伝子ともいう）は、クレアチンデイミナーゼ生産細菌から抽出してもよく、また合成することもできる。上記塩基配列としては、例えば配列表の配列番号2に記載されたアミノ酸配列をコードする塩基配列、または配列表の配列番号1に記載された塩基配列を挙げることができる。なお、本発明のDNA断片は、遺伝子組換え技術により、基本となるDNAの特定部位に、該DNAがコードするクレアチンデイミナーゼの基本的な特性を変化させることなく、或いはその特性を改善するように人為的に変異、例えば置換、削除、挿入などを起こさせたものも含むものである。

【0014】本発明のDNA断片は、例えばバチルス属細菌のDNAを分離・精製した後、超音波、制限酵素などを用いて、DNAを切断化したものとリニヤな発現ベクターとを両DNAの平滑または接着末端部において、DNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターとする。こうして得られた組換えベクターは複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカークレアチンデイミナーゼ活性、あるいはクレアチンデイミナーゼ遺伝子に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションを指標としてスクリーニングして該組換えベクターを保持する微生物を得る。該微生物を培養し、該培養菌体から該組換えベクターを分離・精製し、次いで該組換えベクターからクレアチンデイミナーゼ遺伝子を採取すればよい。

【0015】次にDNAの採取方法をより詳細に説明する。遺伝子の供与体である微生物に由来するDNAは次の如くにして採取する。すなわち、供与微生物である上述した細菌を例えば液体培地で約1～3日間通気攪拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集菌し、次いでこれを溶菌させることによってクレアチンデイミナーゼ遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌方法としては例えばリゾチームや β -グルカナーゼなどの細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要により、プロテアーゼなどの他の酵素やラウリル硫酸ナトリウムなどの界面活性剤が併用され、更に細胞壁の物理的破碎法である凍結融解やフレンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行ってもよい。

【0016】この様にして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには常法に従って例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボスクレア

ゼ処理、アルコール沈澱遠心分離などの方法を適宜組み合わせることにより行なうことができる。微生物から分離・精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などを行なうことができるが、得られる微生物DNA断片とベクターとの結合を容易ならしめる為、制限酵素とりわけ特定ヌクレオチド配列に作用する、例えばEcoRI, Hind III, BamHIなどのII型制限酵素が適している。

【0017】ベクターとしては、宿主微生物で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）を宿主微生物とする場合には、 λ gt10; λ gt11などが使用できる。また、プラスミドとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBluescript, pUC18などが使用できる。

【0018】この様なベクターを、先に述べたクレアチンデイミナーゼ遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが望ましい。微生物DNA断片をベクター断片と結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクター断片との組換えベクターを作成する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に移入して、生体内のDNAリガーゼを利用し、組換えベクターを作成することもできる。

【0019】宿主微生物としては、組換えベクターが安定、且つ自律的に増殖可能で、且つ外来性DNAの形質が発現できるものであればよく、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリ W3110, エシェリヒア・コリ C600, エシェリヒア・コリ JM109, エシェリヒア・コリ HB101, エシェリヒア・コリ DH5 α などが利用できる。

【0020】宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のクレアチンデイミナーゼを安定して生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクター移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカークレアチンデイミナーゼとを同時に発現し得る微生物を検索すればよく、例えば薬剤耐性マーカークレアチンデイミナーゼを産生する微生物を選択すればよい。

【0021】上述の方法により得られたクレアチンデ

イミナーゼ遺伝子の塩基配列は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463~5467(1977)に記載されているジデオキシ法で解読し、またクレアチンデヒミナーゼのアミノ酸配列は塩基配列より推定した。この様にして、一度選択されたクレアチンデヒミナーゼ遺伝子を保有する組換えベクターは、形質転換微生物から取り出され、他の宿主微生物に移入することも容易に実施できる。また、クレアチンデヒミナーゼ遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素などにより切断してクレアチンデヒミナーゼ遺伝子を含有するDNAを切り出し、これを同様な方法により切断して得られるベクター断片とを結合させて、宿主微生物に移入することも容易に実施できる。

【0022】形質転換体である宿主微生物の培養形態は宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、通常多くの場合は液体培養で行うが、工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては炭化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

【0023】培養温度は菌が発育し、クレアチンデヒミナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、エシェリヒア・コリイの場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、クレアチンデヒミナーゼが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を終了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地pHは菌が発育しクレアチンデヒミナーゼを生産する範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH6.0~9.0程度である。

【0024】培養物中のクレアチンデヒミナーゼを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し利用することもできるが、一般には常法に従ってクレアチンデヒミナーゼが培養液中に存在する場合は濾過、遠心分離などにより、クレアチンデヒミナーゼ含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。クレアチンデヒミナーゼが菌体内に存在する場合には、得られた培養物を濾過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いでこの菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的な方法で破壊し、また必要に応じてEDTA等のキレート剤及びまたは界面活性剤を添加してクレアチンデヒミナーゼを可溶化し、水溶液として分離採取する。

【0025】この様にして得られたクレアチンデヒミ

ナーゼ含有溶液を例えば減圧濃縮、膜濃縮、更に硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、或いは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈澱法により沈澱せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。吸着剤或いはゲル濾過剤などによるゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーにより、精製されたクレアチンデヒミナーゼを得る事ができる。

【0026】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。実施例中、クレアチンデヒミナーゼの活性測定は以下のように行なった。すなわち、49mMリン酸緩衝液(pH7.5)、38mMクレアチン、0.29mM NADPH、0.95mM α -ケトグルタル酸、16U/ml グルタミン酸脱水素酵素中で酵素を37℃、3~4分反応させる。クレアチンが加水分解されて生じるアンモニア1分子と α -ケトグルタル酸がグルタミン酸脱水素酵素の働きで結合しグルタミン酸となる際、NADPH1分子が消費される。このNADPHの減少を、1分間当りの340nmの吸光度の減少で測定する。酵素活性の1単位は、この条件下で1分間当たり1マイクロモルのアンモニアを生成する酵素量とした。

【0027】実施例1 クレアチンデヒミナーゼのアミノ酸配列の決定

クレアチンデヒミナーゼ粉末(東洋紡製)を、Superdex200カラムでのゲル濾過クロマトグラフィー及びMono-Qカラムを用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した。最終精製標品をSDS-PAGEでチェックしたところ、ほぼ均一なバンドが得られ、サブユニットの分子量は約43000ダルトンと計算された。この標品を脱塩を兼ねてVydac C4カラムを用いた逆相HPLCでさらに精製し、マニュアルエドマン分解法によってN末端からのアミノ酸配列を決定した(配列表の配列番号3)。また、同標品をアスパラギン酸残基に特異的なプロテアーゼであるAsp-Nによって分解して得たペプチド混合物を逆相HPLCで分離、精製し、マニュアルエドマン分解法によりペプチド断片のアミノ酸配列を決定した(配列表の配列番号4)。

【0028】実施例2 染色体DNAの分離

バチルス・エスピーCNI-1365の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を100mlのLB培地(1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム(pH7.2))で37℃一晚振盪培養後、遠心(8000rpm, 10分)により集菌した。15mMクエン酸ナトリウム、0.15M塩化ナトリウムを含んだ溶液で菌体を洗浄した後、20%シュクロース、1mM EDTA、50mMトリス塩酸(pH7.6)を含んだ溶液5mlに懸濁させ、0.5mlのリゾチーム溶液(100mg/ml)を加えて37℃、30分間保温した。次いで11mlの1%ラウロイルサルコシン酸、0.1M EDTA(pH9.6)を含む溶液を

加えた。この懸濁液に炭化エチジウム溶液を 0.5% 塩化セシウムを約 100% 加え、攪拌混合し、55,000rpm、20 時間の超遠心で DNA を分取した。分取した DNA は、10mM トリス塩酸 (pH8.0)、1mM EDTA を含んだ溶液 (TE) で透析し、精製 DNA 標品とした。エシェリヒア・コリー DH5 α のコンピテントセルは Hanahan の方法により作成し、ライブラリー作成の宿主として用いた。

【0029】実施例3 クレアチンデイミナーゼ遺伝子を含有する DNA 断片及び該 DNA 断片を有する組換えベクターの調製

実施例1で決定したアミノ酸配列をもとに2種類のプローブ (配列表の配列番号5、6) を作成し、実施例2で得た染色体 DNA を鋳型として、PCR 法によるクレアチンデイミナーゼ遺伝子断片の増幅を行ない、約 1kbp の増幅断片を得た。次に、得られた断片をプローブとして実施例2で得た染色体 DNA のサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、6kbp KpnI の特異的バンドが検出された。そこで、この部分の DNA を抽出し、制限酵素 KpnI (東洋紡製) で切断した pBluescript と T4-DNA リガーゼ (東洋紡製) で反応させ、DNA を連結した。連結した DNA はエシェリヒア・コリー DH5 α のコンピテントセルを用いて形質転換した。得られたコロニーを PCR 法で増幅した断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングして、クレアチンデイミナーゼ遺伝子を含有する 6kbp KpnI DNA 断片を持つ組換えベクターを得、pCD1 と命名した。

【0030】次いで pCD1 の挿入 DNA 断片を、種々の制限酵素による消化処理後、pBluescript にサブクローニングし、種々の挿入 DNA 断片を有する派生プラスミドを得、エシェリヒア・コリー DH5 α を形質転換した。pCD1 及びその派生プラスミドの挿入 DNA 制限酵素地図を図1に示した。

【0031】実施例4 塩基配列の決定

pCD1 の派生プラスミドである pCD2 の挿入 DNA 断片について、種々の制限酵素で切断してサブクローンを調製した。種々のサブクローンは常法に従い、SEQUENCE VERSION 2.0 7-deaza-dGTP kit (東洋紡製) を用いて塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列及びアミノ酸配列を配列表の配列番号1および配列番号2に示した。

【0032】実施例5 形質転換体の培養とクレアチンデイミナーゼの生成 (1)

クレアチンデイミナーゼ生産培地 (0.5% 酵母エキス、1.0% ポリペプトン、0.5% NaCl (pH7.5)) 50ml を 500ml

配列

```
CTGCAGCTGT CCTCGGACCA GTTACCTCGA CCACCTCAAC CCCCGATGAA AACTATCGAG 60
GTTCTCGGAC AAGGCTAAGC GGAGGTCCCC GATGCAGAGG CAATGCTGAG AAATATCTA 120
CGACAGCTCA CCAITTTTAT TTAATCCAC ACTAATACCT GTCAAGCAAT AGAATAGATA 180
GCAITCGGAT CCTCCAGAGT TTGAAATAT GCCTTGACAT GTAGAAATGG AGITCTT 237
GTG CGC ATT ACA AAC GCC CAG GTT AAG AAC TAC GCA GAG TTA GTT GAT 285
```

1 フラスコに分注し、121℃、15分間オートクレーブを行ない放冷後、別途無菌濾過した抗生物質 (50mg/ml アンピシリン (ナカライテスク製)) を添加した。この培地に上記と同一組成の培地で予め 30℃ で 18 時間振盪培養した pCD2 組換え体の培養液 5ml を接種し、30℃ で通気攪拌培養した。培養開始より 20 時間後で、pCD2 組換え体は、誘導物質であるクレアチンを培地に添加することなしに、約 0.15U/ml のクレアチンデイミナーゼ活性を示した。同条件下で、バチルス・エスビー CN1-1365 のクレアチンデイミナーゼ活性は検出限界以下であった。すなわち、本発明のクレアチンデイミナーゼ遺伝子がエシェリヒア・コリー内において、誘導物質なしに効率的に発現することが明らかとなった。

【0033】実施例6 形質転換体の培養とクレアチンデイミナーゼの生成 (2)

pCD2 組換え体を実施例5と同様の条件にて、培養温度のみ 37℃ に変更して培養を行った。培養開始より 20 時間後で、pCD2 組換え体は誘導物質であるクレアチンを培地に添加することなしに、約 1.7U/ml のクレアチンデイミナーゼ活性を示した。すなわち培養温度の最適化により、生産性の大幅な向上が見込めることが明らかとなった。

【0034】

【発明の効果】本発明によってクレアチンデイミナーゼ遺伝子の塩基配列及びアミノ酸配列が明らかになり、遺伝子工学的手法によりクレアチンデイミナーゼを容易に高純度で大量生産することが出来る。また、クレアチンデイミナーゼ生産の際に必要であった誘導物質であるクレアチンが、本発明の製造法を用いることにより不要となった。さらに、本発明のクレアチンデイミナーゼ遺伝子と種々の蛋白質工学的手法とを用いることにより、より高活性な、或いはより安定性の高い新規クレアチンデイミナーゼを作ることにも可能になる。

【0035】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1591

配列の型: 核酸 (DNA)

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: バチルス・エスビー (Bacillus sp.)

株名: CN1-1365

(6)

特開平7-143881

9
 Met Arg Ile Thr Asn Ala Glu Val Lys Asn Tyr Ala Glu Leu Val Asp
 1 5 10 15
 ATC ACC ATA GAG GGT GAA AGA ATC TCA ACT ATT ACC CCC TCC GCG CTT 333
 Ile Thr Ile Glu Gly Glu Arg Ile Ser Thr Ile Thr Pro Ser Ala Leu
 20 25 30
 CGA CCA GAA GAA GAT CGC CGC GCG GAC GAT TAC GAT GCC GCA GGA AGA 381
 Arg Pro Glu Glu Asp Arg Arg Ala Asp Asp Tyr Asp Ala Ala Gly Arg
 35 40 45
 CTG GTC TCA CCC CAG TTC GCC GAA GCA CAC ATC CAC CTT GAC TAC GCA 429
 Leu Val Ser Pro Gln Phe Ala Glu Ala His Ile His Leu Asp Tyr Ala
 50 55 60
 AAC ACC GCG GGA GTA CCT CGC GAA AAT TCT TCT GGC ACA CTT TTT GAA 477
 Asn Thr Ala Gly Val Pro Arg Glu Asn Ser Ser Gly Thr Leu Phe Glu
 65 70 75 80
 GCC ATC GAA ATC TGG GCC GAC CGC AAA ACC CAA GGC TTC CAC ATC AAA 525
 Ala Ile Glu Ile Trp Ala Asp Arg Lys Thr Gln Gly Phe His Ile Lys
 85 90 95
 GAG GAT ATT AAA GCG AAA GCT CTC CAG GCA GCC CGT CGG GCA GCA GAA 573
 Glu Asp Ile Lys Ala Lys Ala Leu Gln Ala Ala Arg Arg Ala Ala Glu
 100 105 110
 CAC GGC GTT GGC TTC ATC CGC ACC CAT GTA GAC GTT ACA GAT CCC ACC 621
 His Gly Val Gly Phe Ile Arg Thr His Val Asp Val Thr Asp Pro Thr
 115 120 125
 TTC GCC GGG TTT GAA GCA ATT GCG GAG CTG CGC GAT GAA GTC CGC GAG 669
 Phe Ala Gly Phe Glu Ala Ile Ala Glu Leu Arg Asp Glu Val Arg Glu
 130 135 140
 TGG TGC GAT ATC CAG ATT GTC GCC TTC CCG CAA AAT GGC ATT TAC GCC 717
 Trp Cys Asp Ile Gln Ile Val Ala Phe Pro Gln Asn Gly Ile Tyr Ala
 145 150 155 160
 TAC GAA GGT GGC CAG AAG CTA ATC TCA GAT GCA ATG TCT GCA GGT GCA 765
 Tyr Glu Gly Gly Gln Lys Leu Ile Ser Asp Ala Met Ser Ala Gly Ala
 165 170 175
 GAT GTC GTT GGT GGC ATC CCA CAC CTT GAA CCC ACC CGA GAT GAT GGT 813
 Asp Val Val Gly Gly Ile Pro His Leu Glu Pro Thr Arg Asp Asp Gly
 180 185 190
 GTC GAG TCG GTG AAA TGG CTT TTC GAC CTT GCA GAG AAG CAC TCA GCC 861
 Val Glu Ser Val Lys Trp Leu Phe Asp Leu Ala Glu Lys His Ser Ala
 195 200 205
 CCC ATC GAT ATC CAC ACC GAT GAA ATT GAC GAT CCA CAT TCC CGA TTT 909
 Pro Ile Asp Ile His Thr Asp Glu Ile Asp Asp Pro His Ser Arg Phe
 210 215 220
 GTC GAA GTC CTC GCC GCA GAA GCC GCA AAA CGT GAC ATG GGC GCA CAA 957
 Val Glu Val Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Arg Asp Met Gly Ala Gln
 225 230 235 240
 ACC GTG GTG TCC CAT TCT GTT GCG ATG GCA TAT TAT TCA CCT GGC TAC 1005
 Thr Val Val Ser His Ser Val Ala Met Ala Tyr Tyr Ser Pro Gly Tyr
 245 250 255
 ATG GCG CGA CTT TTA CCC AAG CTC GCA GCA TCA AAG GTT CGT TTT GCA 1053
 Met Ala Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Arg Phe Ala
 260 265 270

(7)

特開平7-143881

11
 GTA TGC CCC AAT GAA AAC CTC CAT CTG CAA GGA CTT GGT TTC CAA GGA 1101
 Val Cys Pro Asn Glu Asn Leu His Leu Gln Gly Leu Gly Phe Gln Gly
 275 280 285
 CCC GTC CCC CGA GGT GTT GCA CCG GTA AAG CAA CTT ACC GAA TGG GGA 1149
 Pro Val Pro Arg Gly Val Ala Pro Val Lys Gln Leu Thr Glu Trp Gly
 290 295 300
 ATT CCA GTA AGT TTT TGC CAG GAC TCA CTC AAT GAC CCC TTC TAC CCC 1197
 Ile Pro Val Ser Phe Cys Gln Asp Ser Leu Asn Asp Pro Phe Tyr Pro
 305 310 315 320
 ATG GGC GAT GGA GAT CTA CTC CGC ATT CTC GAT TCT GGA TTA CAC GTG 1245
 Met Gly Asp Gly Asp Leu Leu Arg Ile Leu Asp Ser Gly Leu His Val
 325 330 335
 TCC CAC ATG CTC ACA GCC AGC CAC TTG AAG AAT GCA CTA TCG TTC ATC 1293
 Ser His Met Leu Thr Ala Ser His Leu Lys Asn Ala Leu Ser Phe Ile
 340 345 350
 ACC ACC AAT CCA GCC GGA AAC CTA GGC CTG GAC AAT TAC GAC ATT GCA 1341
 Thr Thr Asn Pro Ala Gly Asn Leu Gly Leu Asp Asn Tyr Asp Ile Ala
 355 360 365
 GAA AAC TCC CCG GCG AAC CTG CTG GTT CTT GAT GCG AGC AGC GAG AAG 1389
 Glu Asn Ser Pro Ala Asn Leu Leu Val Leu Asp Ala Ser Ser Glu Lys
 370 375 380
 GAA GCT GTA CAA AGA AAA GCT TCC GTA CTT TGAGCATCCA CCGCGGCAAA 1439
 Glu Ala Val Gln Arg Lys Ala Ser Val Leu
 385 390
 AAGGTGCTCT CCAGGGAGCC CGAACAGGTG GACTGGAACA TCTAACAGCC CAGTTGGGCC 1499
 TCCITAAATT TTGTGGCACT CCCACATTT CTATCAATCT ATAGAAAGTA TGACTTAAGT 1559
 CGATTTTGCA AGTTTCTATA GATTGATAGA AA 1591

【0036】配列番号: 2

配列の長さ: 394

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 蛋白質

起源

30 生物名: バチルス・エスピー(Bacillus sp.)

株名: CNI-1365

配列

Val Arg Ile Thr Asn Ala Gln Val Lys Asn Tyr Ala Glu Leu Val Asp
 1 5 10 15
 Ile Thr Ile Glu Gly Glu Arg Ile Ser Thr Ile Thr Pro Ser Ala Leu
 20 25 30
 Arg Pro Glu Glu Asp Arg Arg Ala Asp Asp Tyr Asp Ala Ala Gly Arg
 35 40 45
 Leu Val Ser Pro Gln Phe Ala Glu Ala His Ile His Leu Asp Tyr Ala
 50 55 60
 Asn Thr Ala Gly Val Pro Arg Glu Asn Ser Ser Gly Thr Leu Phe Glu
 65 70 75 80
 Ala Ile Glu Ile Trp Ala Asp Arg Lys Thr Gln Gly Phe His Ile Lys
 85 90 95
 Glu Asp Ile Lys Ala Lys Ala Leu Gln Ala Ala Arg Arg Ala Ala Glu
 100 105 110
 His Gly Val Gly Phe Ile Arg Thr His Val Asp Val Thr Asp Pro Thr
 115 120 125
 Phe Ala Gly Phe Glu Ala Ile Ala Glu Leu Arg Asp Glu Val Arg Glu
 130 135 140

(8)

特開平7-143881

13

14

Trp Cys Asp Ile Gln Ile Val Ala Phe Pro Gln Asn Gly Ile Tyr Ala
 145 150 155 160
 Tyr Glu Gly Gly Gln Lys Leu Ile Ser Asp Ala Met Ser Ala Gly Ala
 165 170 175
 Asp Val Val Gly Gly Ile Pro His Leu Glu Pro Thr Arg Asp Asp Gly
 180 185 190
 Val Glu Ser Val Lys Trp Leu Phe Asp Leu Ala Glu Lys His Ser Ala
 195 200 205
 Pro Ile Asp Ile His Thr Asp Glu Ile Asp Asp Pro His Ser Arg Phe
 210 215 220
 Val Glu Val Leu Ala Ala Glu Ala Ala Lys Arg Asp Met Gly Ala Gln
 225 230 235 240
 Thr Val Val Ser His Ser Val Ala Met Ala Tyr Tyr Ser Pro Gly Tyr
 245 250 255
 Met Ala Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala Ala Ser Lys Val Arg Phe Ala
 260 265 270
 Val Cys Pro Asn Glu Asn Leu His Leu Gln Gly Leu Gly Phe Gln Gly
 275 280 285
 Pro Val Pro Arg Gly Val Ala Pro Val Lys Gln Leu Thr Glu Trp Gly
 290 295 300
 Ile Pro Val Ser Phe Cys Gln Asp Ser Leu Asn Asp Pro Phe Tyr Pro
 305 310 315 320
 Met Gly Asp Gly Asp Leu Leu Arg Ile Leu Asp Ser Gly Leu His Val
 325 330 335
 Ser His Met Leu Thr Ala Ser His Leu Lys Asn Ala Leu Ser Phe Ile
 340 345 350
 Thr Thr Asn Pro Ala Gly Asn Leu Gly Leu Asp Asn Tyr Asp Ile Ala
 355 360 365
 Glu Asn Ser Pro Ala Asn Leu Leu Val Leu Asp Ala Ser Ser Glu Lys
 370 375 380
 Glu Ala Val Gln Arg Lys Ala Ser Val Leu
 385 390

【0037】配列番号：3

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：バチルス・エスピー(Bacillus sp.)

株名：CNI-1365

配列

Met Arg Ile Thr Asn Ala Gln Val Lys

1

5

【0038】配列番号：4

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：バチルス・エスピー(Bacillus sp.)

株名：CNI-1365

配列

配列の特徴

他の情報

Xaa はLeu 又はMet である。

Asp Pro Phe Tyr Pro Xaa

1

5

40 【0039】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖

ホモロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGCCGATATCIAATGCCICA 20

【0040】配列番号：6

配列の長さ：17

50 配列の型：核酸 (DNA)

鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
配列

15

(9)

特開平7-143881

16

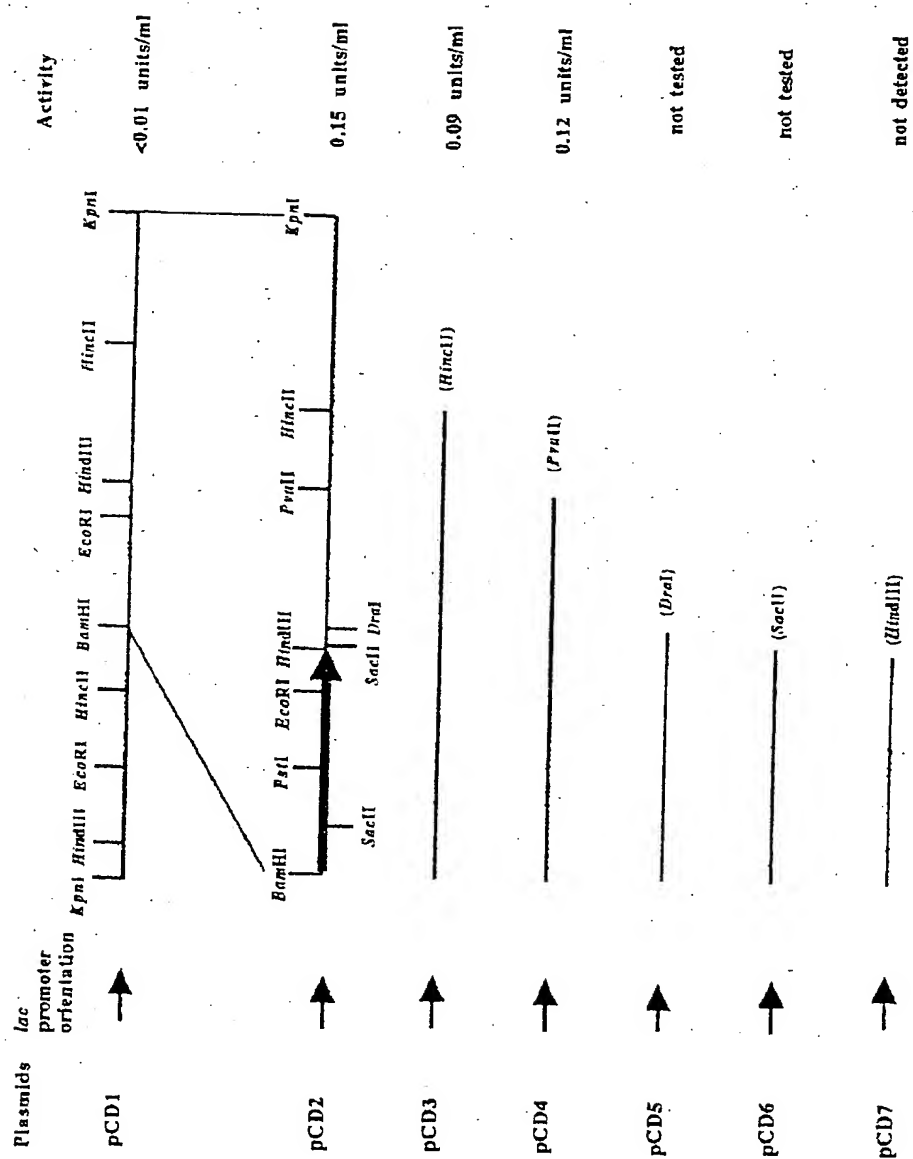
CTRGGAAGA TGGGIGA

17

【図面の簡単な説明】

【図1】 pCD1 及びその派生プラスミドの挿入DNAの制限酵素地図を示す。

【図1】



(10)

特開平7-143881

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶

//(C12N 15/09

C12R 1:07)

(C12N 1/21

C12R 1:19)

(C12N 9/78

C12R 1:19)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

ZNA

C12R 1:07)